

Feed additive containing D-pantothenic acid and/or its salts and method for their preparation

Publication number: EP1050219 (A1)

Publication date: 2000-11-08

Inventor(s): BINDER MICHAEL DR [DE]; UFFMANN KLAUS-ERICH [DE]; WALGER ILONA DR [DE]; BECKER ULRICH DR [SK]; PFEFFERLE WALTER DR [DE]; FRIEDRICH HEINZ DR [DE]

Applicant(s): DEGUSSA [DE]

Classification:

- international: A23K1/00; A23K1/16; A23K1/175; C12P13/02; A23K1/00;
A23K1/16; A23K1/175; C12P13/00; (IPC1-7): A23K1/16

Also published as:

- EP1050219 (B1)
- SK8452000 (A3)
- SK283900 (B6)
- RU2245628 (C2)
- PT1050219 (E)

more >>

- European: A23K1/16B; C12P13/02

Application number: EP20000106826 20000426

Priority number(s): DE19991020507 19990505; DE20001016321 20000331

Cited documents:

- GBS98177 (A)
- GB784434 (A)
- XP004103426 (A)

Abstract of EP 1050219 (A1)

Animal feed additive based on fermentation liquor containing D-pantothenic acid (I) and/or its salts, contains (a) (I) and/o its salts, (b) 0-100% biomass from microorganisms producing (I) during fermentation and (c) mainly other contents of the fermentatio liquor and (d) is in solid, finely-divided or granulated, free-running form. Independent claims are also included for methods of producing animal feed additives containing (I) and/or its salts.

Data supplied from the esp@cenet database --- Worldwide



Europäisches Patentamt

(19)

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 050 219 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
08.11.2008 Patentblatt 2008/45

(51) Int. CL⁷: A23K 1/16

(21) Anmeldenummer: 00108826.9

(22) Anmeldetag: 26.04.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 05.05.1999 DE 19920507
31.03.2000 DE 10015321

(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• Binder, Michael, Dr.
33803 Steinhegen (DE)
• Uffmann, Klaus-Erich
33611 Bielefeld (DE)
• Weiger, Ilona, Dr.
33607 Bielefeld (DE)
• Becker, Ulrich, Dr.
97611 Selce (SK)
• Pfefferle, Walter, Dr.
33780 Halle (DE)
• Friedrich, Heinz, Dr.
63457 Hanau (DE)

(54) D-Pentothenäsäure und/oder deren Salze enthaltende Futtermittel-Additive und Verfahren zu deren Herstellung

(57) Die Erfindung betrifft ein Futtermitteladditiv auf Fermentationsbrühbasis, das man durch Fermentation von D-Pentothenäsäure bildenden Mikroorganismen gewinnt und eines oder mehrere Salze der D-Pentothenäsäure, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalze, gegebenenfalls unter Zusatz einer oder mehrerer dieser Verbindungen, enthält.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Tierfuttermittel-Additiv auf Fermentationsbrühbasis, das D-Pantothensäure und/oder eines ihrer Salze enthält und Verfahren zur Herstellung dieses Additivs.

Stand der Technik

[0002] Pantothensäure wird weltweit in einer Größenordnung von mehreren tausend Tonnen pro Jahr produziert. Ein grosser Teil der produzierten Pantothensäure wird für die Ernährung von Nutztieren wie Geflügel und Schweine verwendet. Der Bedarf steigt.

[0003] Pantothensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Vorstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutyraldehyd und Cyanid hergestellt, in weiteren Verfahrensschritten des racemischen Gemisch aufgetrennt, das D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und so D-Pantothensäure erhalten.

[0004] Die typische Handelsform ist das Calcium-Salz der D-Pantothensäure. Das Calcium-Salz des racemischen Gemisches der D,L-Pantothensäure ist ebenfalls gebräuchlich.

[0005] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren Form, nämlich der D-Form, die frei von L-Pantothensäure ist.

[0006] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. Escherichia coli, Arthrobacter ureafaciens, Corynebacterium erythrogenes, Brevibacterium ammoniagenes und auch Hefen, wie z. B. Debaryomyces castellii können, wie in EP-A-0 493 060, EP-A-0 590 857 und WO 97/10340 gezeigt, unter geeigneten Fermentationsbedingungen D-Pantothensäure produzieren. Besonders geeignete Mikroorganismen sind die dort beschriebenen Derivate von Escherichia coli IF03547 wie z. B. die Stämme FV5069/pFV31 oder FV5069/pFV202.

[0007] Bei der fermentativen Herstellung der D-Pantothensäure, wie sie in EP-A-0 493 060, EP-A-0 590 857 und WO 97/10340 beschrieben ist, wird ein zur D-Pantothensäure Produktion befähigter Mikroorganismus in einem geeigneten Nährmedium kultiviert und die gebildete D-Pantothensäure anschließend in aufwendiger Weise isoliert, gereinigt und als Calciumsalz dargestellt.

[0008] Geeignete Nährmedien enthalten eine Kohlenstoffquelle wie z. B. Glucose oder Stärkemehydrolysat oder Sucrose oder Malasse, Vorstufen wie z. B. β -Alanin, D,L-Pantohensäure oder DL-Pantolacton, eine Stickstoffquelle wie z. B. Ammoniumsulfat, eine Phosphor-Quelle wie z. B. Kaliumphosphat und weitere Salze, Spurenelemente und Vitamine und gegebenenfalls komplexe Medienzusätze wie z. B. Hefeextrakt. Die

Mikroorganismen werden dann in diesem Medium bei einem geeigneten pH-Wert unter entsprechender Belebung und Rührung inkubiert, wobei diese dann D-Pantothensäure ausscheiden.

[0009] Nach dem derzeitigen Stand der Technik, der in WO96/33283 und EP-A-0 590 857 dargestellt ist, wird das Calciumsalz der D-Pantothensäure durch eine aufwendige Isolierung und Reinigung aus der pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe gewonnen.

Nach einer ersten Abtrennung der Biomasse durch Filtration oder Zentrifugation erfolgt die weitere Aufarbeitung des Filtrates durch Reinigung mittels Aktivkohle oder durch Stäulenchromatographie. Nach der Umsetzung der so erhaltenen Lösungen mit Calciumhydroxid lässt man das gewünschte Ca-Salz auskristallisieren.

[0010] Gemäß der WO 96/33283 entfärbt man das Filtrat mit Aktivkohle in der ersten Säule. Mit konzentrierter Salzsäure wird ein pH-Wert von 3,0 eingestellt und die Flüssigkeit anschließend kontinuierlich über

zwei weitere mit Aktivkohle gepackten Säulen gereinigt. Die Elution der D-Pantothensäure erfolgt mit Hilfe von Methylalkohol. Nach der sich anschließenden Neutralisation mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Pulver erhält man eine Lösung, aus der man das Calcium D-Pantothenat durch Kristallisation bei 5 °C gewinnt.

[0011] Bei der in EP-A-0 590 857 beschriebenen Methode reinigt man das Filtrat zunächst mit Hilfe von Kationen- und Anionenaustauschersäulen. Die Elution erfolgt mit Salzsäure. Die eluierte Fraktion wird anschließend mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ neutralisiert, mit Aktivkohle versetzt und abfiltriert. Das gewonnene Filtrat wird dann in einem niedermolekularen Alkohol (Methanol, Ethanol, Isopropanol) extrahiert und das Calcium D-Pantothenat durch Kristallisation gewonnen.

[0012] Das auf die beschriebene Weise hergestellte Calcium D-Pantothenat wird als Zusetz in Futtermitteln für die Tierernährung verwendet.

Aufgabe der Erfindung

40

[0013] Nach dem Stand der Technik werden Salze der D-Pantothensäure und D,L-Pantothensäure durch Umsetzung der durch chemische Synthese oder Fermentation hergestellten Säuren mit den gewünschten Salzlösungen hergestellt.

[0014] Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue als Futtermitteladditive geeignete Zubereitungsformen der D-Pantothensäure und ihrer Salze zur Verfügung zu stellen.

[0015] Weiterhin ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Herstellverfahren zur Verfügung zu stellen, dass ökonomischer und leistungsfähiger als die gegenwärtig bekannten Verfahren ist.

Beschreibung der Erfindung

[0016] Gegenstand der Erfindung ist ein Tierfuttermittel-Additiv auf Fermentationsbrühe-Basis, das

dadurch gekennzeichnet ist, daß es

net, sprühgranuliert oder granuliert.

- a) D-Pantothensäure und/oder deren Salze, insbesondere Alkal- oder Erdalkal-Salze
- b) die während der Fermentation gebildete Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %
- c) zumindest den überwiegenden Teil der weiteren gelösten Inhaltsstoffe der Fermentationstrühe enthält und
- d) in fester Form, insbesondere feinteilig oder granuliert und rießfähig, vorliegt.

10

[0017] Die Additive liegen im allgemeinen je nach Anforderung als sprühgetrocknete oder rießfähige, feinteilige, rießfähige Pulver, aber auch in granulierter Form vor, die unterschiedliche Anteile an Biomasse enthalten können. Die Schüttdichte liegt insbesondere bei ca. 500 kg/m³. Die Additive sind lagerstabil.

15

[0018] Wird die Biomasse abgetrennt, werden natürlich auch weitere, zum Beispiel anorganische Feststoffe entfernt. Daraus entfällt das erfundungsgemäß Additiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationstrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

25

[0019] Zu diesen Stoffen können organische Nebenprodukte gehören, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen neben der D-Pantothensäure erzeugt und ausgeschieden werden. Dazu gehören L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Methionin, L-Lysin, L-Vein, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan, insbesondere L-Vein. Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie z. B. Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch schlecht verwertbarer Zucker wie z. B. Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die Wertigkeit des Additivs verbessern.

30

[0020] Zu diesen Stoffen gehören weiterhin Reste der eingesetzten verwertbaren Zucker wie z. B. Glucose oder Saccharose.

40

[0021] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltenden Futtermittel-Additivs, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) eine im allgemeinen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium-, oder Calciumsalze der enthaltende D-Pantothensäure-enthaltenden Brühe durch Fermentation herstellt;
- b) aus dieser gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse abtrennt,
- c) die so erhaltene Lösung bzw. Brühe mit dem Hydroxid oder Oxid eines Erdalkal- oder Alkalimetalls in vorzugsweise stöchiometrischen Mengen, bezogen auf die D-Pantothensäure, versetzt und
- d) das so erhaltene Gemisch trocknet, sprührock-

55

[0022] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zur Herstellung von Tierfuttermittel-Additiven mit einem Gehalt an D-Pantothensäure und/oder dessen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalzen in dem Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% (Trockenmasse) aus Fermentationstrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

a) bevorzugt Entfernen von Wasser aus der Fermentationstrühe (Aufkonzentration)

b) gegebenenfalls Entfernen der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %.

c) Zusatz von einer oder mehreren der genannten Verbindungen zu den gemäß a) und b) erhaltenen Fermentationstrühen, wobei die Menge der zugesetzten Verbindungen so bemessen ist, daß deren Gesamtkonzentration im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-%, insbesondere 50 bis 80 Gew.-%, liegt, und

d) Trocknen der gemäß c) erhaltenen Fermentationstrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

[0023] Geeignet für das erfundungsgemäß Verfahren sind Fermentationstrühen, die unter Verwendung von zur Produktion von D-Pantothensäure geeigneten Mikroorganismen gewonnen werden und D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthalten.

[0024] Bei den Mikroorganismen kann es sich um Pilze oder Hefen wie zum Beispiel Debaryomyces castellii oder Gram-positive Bakterien zum Beispiel der Gattung Corynebacterium oder um Gram-negative Bakterien wie zum Beispiel die der Familie Enterobacteriaceae handeln. Bei der Familie der Enterobacteriaceae ist besonders die Gattung Escherichia mit der Art Escherichia coli zu nennen, innerhalb der Art Escherichia coli sind die sogenannten K-12 Stämme wie zum Beispiel die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhardt et al.: Escherichia coli and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) oder der Escherichia coli Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Unter den aus aus IFO3547 hergestellten Stämmen zeichnen sich wiederum FV5069/pFV31 (EP-A-0 590 857) und FV5069/pFV202 (WO 97/10340) aus. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen.

[0025] Die oben beschriebenen Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulei-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der D-Pantothensäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmeli (Bioprozesstechnik 1, Einführung in die Bioprozesstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und peripherie Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) beschrieben.

[0026] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmiedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology, the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojabl., Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosöl, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquellen können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Matzextrakt, Maiskeimwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumhydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisenulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies Vorstufen der D-Pantothensäure wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantothäure oder Pantinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansetzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugeführt werden.

[0027] Zur Kontrolle des pH-Wertes werden bevorzugt Ammoniak oder Ammoniumwasser verwendet. Andere basische Verbindungen wie Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid sind ebenfalls geeignet. Werden saure Verbindungen benötigt, setzt man Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise ein. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung verwendet man Antischäummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden werden dem Medium gegebenenfalls geeig-

nete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuhalten, werden Sauerstoff und Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an D-Pantothensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 180 Stunden erreicht.

[0028] Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten D-Pantothensäure in einer Konzentration von > 0 bis 20 Gew.-%. Besonders vorteilhaft sind solche Fermentationsverfahren, bei denen die D-Pantothensäure zu 2 bis 20 Gew.-% in der Trockenmasse nach Beendigung der Fermentation vorliegt.

[0029] Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, vorteilhaft jedoch über mindestens 30 % der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, daß während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 8 g/l gehalten bzw. darauf abgesenkt wird.

[0029] In einer Ammoniumlösung enthaltenden Variante zur Herstellung der erfundungsgemäß Fermentationsbrühen, gegebenenfalls zunächst durch bekannte Separationsmethoden wie zum Beispiel der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus vollständig oder zum Teil von der Biomasse befreit. Es ist erfundungsgemäß jedoch auch möglich, die Biomasse gänzlich in der Fermentationsbrühe zu belassen. Anschließend wird diese Brühe im allgemeinen mit 0,8 bis 1,2, vorzugsweise 0,95 bis 1,1 Äquivalenten, eines Oxids oder Hydroxids eines Alkalien oder Erdalkali-Metalls, insbesondere NaOH, KOH, Ca(OH)_2 , oder MgO , bezogen auf die D-Pantothensäure, versetzt. Bei geringen D-Pantothensäurekonzentrationen kann es vorteilhaft sein, auch deutlich höhere Mengen der Oxide oder Hydroxide einzusetzen, zum Beispiel im Bereich 1,2 bis 4 Äquivalenten. Die auf diese Weise erhältliche Suspension wird vor der Trocknung im allgemeinen auf maximal 60 Gew.-% Trockenmasse konzentriert. Es ist gleichfalls möglich, die Fermentationsbrühe zunächst zu konzentrieren und dann die Oxide oder Hydroxide hinzuzufügen. Das erhaltene Konzentrat wird dann in einem üblichen Trockner oder beispielsweise mit Hilfe eines Fallfilmverdampfers oder eines Dünnschichtverdampfers oder eines Sprühverdampfers oder eines Sprühgranulator oder einer Gefriertrocknungsanlage als rieselfähiges, frei fließendes, feinteiliges Pulver oder Granulat gewonnen. Eine Granulation kann auch im Anschluß an die Trocknung stattfinden, zum Beispiel in Form der Aufbaugranulation.

[0030] Die Erfinder fanden weiterhin eine neue Methode, um Ammonium-, Kalium-, Natrium-, Magnesium- oder Calcium-D-Pantothensäure-Salze enthaltende Pulver oder diese enthaltende

Zubereitungsformen auf schnelle und kostengünstige Weise herzustellen. Hierzu wird eine unter Verwendung der entsprechenden Hydroxy-Verbindungen hergestellte, D-Pantothenäure-haltige Fermentationsbrühe gegebenenfalls zunächst durch bekannte Separationsmethoden wie zum Beispiel der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus ganz oder zum Teil von der Biomasse befreit. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich, die Biomasse gänzlich in der Fermentationsbrühe zu belassen. Anschließend wird die gegebenenfalls vorbehandelte Brühe mit bekannten Methoden zum Beispiel mittels eines Rotationsverdampfers oder Dönnschichtverdampfers oder Falltrockenverdampfers eingedickt oder getrocknet. Die gegebenenfalls aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Sprüh- Trocknung, Sprühgranulation oder Gefriertrocknung oder durch andernwälige Verfahren zu einem rieselfähigen, frei liegenden, feintzilligen Pulver oder Granulat verarbeitet.

[0031] Die erfindungsgemäßen neuen Tierfuttermittel-Additive enthalten im allgemeinen 20 - 80 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 75 Gew.-% D-Pantothenäure und/oder deren Salze, bezogen auf die Gesamtmenge. Sie enthalten zusätzlich im allgemeinen anorganische Bestandteile mit einer Menge von 2,5 - 25 Gew.-% und gegebenenfalls organische Nebenprodukte in einer Menge von > 0 bis 30 Gew.-%. Der Anteil an Biotrockenmasse beläuft sich auf 0 bis 35 Gew.-%. Der Wassergehalt liegt bevorzugt bei < 5 Gew.-%. Der gewünschte Gehalt an D-Pantothenäure und/oder einem oder mehreren der genannten Salze wird gegebenenfalls durch Zusatz der entsprechenden Verbindungen zu den fermentativ hergestellten Produkten erzielt. Die gewünschten Verbindungen werden bevorzugt vor der Trocknung oder Sprüh- Trocknung, insbesondere nach der Aufkonzentrierung, dem Gemisch in Form von Lösungen oder Trockensubstanz zugesetzt und mit diesen vermischt. Das so erhaltene Produkt wird als Futtermitteladditiv eingesetzt.

[0032] Die Konzentration an D-Pantothenäure kann mit bekannten Verfahren (Velsic; Chromatographic Science 60, 515-580 (1992)) bestimmt werden.

Beispiele

[0033] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Zu diesem Zweck wurden Versuche mit dem D-Pantothenäure produzierenden Stamm *Escherichia coli* 5059/pFV31 durchgeführt, der als FERM-BP 4395 gemäß Budapestener Vertrag beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology in 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki (Japan) hinterlegt ist.

Beispiel 1

Herstellung einer D-Pantothenäure haltigen Fermentationsbrühe

1. Herstellung des Inkultums

[0034] Eine Probe von *Escherichia coli* FV5059/pFV31 wurde auf LBG-Agar ausgestrichen, der mit 50 µg pro ml Ampicillin supplementiert worden war. Diese Agarplatten-Kultur wurde 17 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Ausgewählte Einzelkolonien wurden anschließend in LBG-Bouillon weiter vermehrt. LBG-Bouillon hat folgende Zusammensetzung: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl und 1 g/l Glucose. LBG-Agar enthält zusätzlich 12 g/l Agar. Vorgefertigte Zubereitungen können von der Firma Gibco/BRL (Paisley, Schottland, Großbritannien) als LB Broth Base oder LB-Agar bezogen werden. Nach Zusatz von 1 g/l Glucose erhält man dann die angegebenen Medien. Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeyerkolben ansethnen waren, wurden für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Im Anschluß wurde die Zellsuspension auf einer J-6B Zentrifuge der Firma Beckmann (Hannover, Deutschland) 15 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml LBG-Medium, das mit 20% Glycerin supplementiert worden war, resuspendiert und in 10 Aliquote je 1 ml unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei -70°C eingefroren. Diese Kulturen wurden als „master-Zellbank (master cell bank)“ verwendet.

[0035] Für die Herstellung einer Arbeitszellbank (working cell bank) wurde LBG-Medium, das mit 50 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war, in 10 ml Portionen in 100 ml Erlenmeyerkolben verteilt und anschließend mit 100 µl der oben beschriebenen „master-Zellbank“ beimpft. Die Inkubation erfolgte für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz). Nach der Inkubation wurde die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 680 nm bestimmt. Sie betrug 3,5. Anschließend wurde die Zellsuspension in sterilen 30 ml Polyethylenröhrchen der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen abgeteilt und bei 2500 rpm für 15 Minuten mit einer Zentrifuge vom Typ J-6B der Firma Beckmann (Hannover, Deutschland) abzentrifugiert. Die abgetrennte Biomasse wurde in 10 ml LBG-Medium, das mit 20% Glycerin supplementiert worden war, resuspendiert. Im Anschluß wurde die Zellsuspension in 500 µl Portionen in 1 ml sterilen, der Firma Nalgenes (New York, U.S.A.) unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei -70°C eingefroren. Die auf diese Weise hergestellten Konserven wurden als Arbeitszellbank (working cell bank) verwendet.

2. Herstellung einer D-Pantothensäure halitigen Fermentationstrühe

[0036] Zur Herstellung einer Pantothensäure-halitigen Fermentationstrühe wurde die Arbeitszellbank zunächst in einer Schüttelkolbenkultur vermehrt und dies zur Beimpfung eines Vorfermenters verwendet. Die Kultur des Vorfermenters wurde zur Beimpfung des Produktionsfermenters verwendet.

[0037] Für die Schüttelkolbenkultur wurde das Medium SKA verwendet. Medium SKA wurde folgendermassen zubereitet. In einem 1 l Becherglas wurden 7,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, und 20 g Maisquelwasser abgewogen, das zuvor mit 25%iger Ammoniaklösung auf pH 6,8 eingestellt worden war, und anschliessend 875 ml destilliertes Wasser dazugegeben. Diese Maisquelwasser halitige Salzlösung wurde im Autoklav bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Weiterhin wurde eine Lösung bestehend aus 125 ml destilliertem Wasser, 28,7 g Glucose und 0,002 g Thiamin-HCl durch Filtration sterilisiert. 10 g CaCO_3 wurden in einem 100 ml Kolben abgewogen und im Autoklaven bei 123°C für 20 Minuten sterilisiert. Durch Vereinigung der beiden oben genannten Komponenten mit der Maisquelwasser halitigen Salzlösung wurde das Medium SKA erhalten.

[0038] Dieses Medium SKA wurde in 12,5 ml Portionen in 100 ml Erlenmeyerkolben verteilt und anschliessend mit 0,5 ml einer Zellsuspension beimpft. Als Zellsuspension wurde eine mit steriler physiologischer Kochsalzlösung 1:100 verdünnte Konservierung der Arbeitszellkultur verwendet. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 32°C und 150 rpm auf einem RC-1-TK Inkubator der Firma Infris AG (Bottmingen, Schweiz). Die im Anschluss daran bestimmte optische Dichte bei einer Messwellenlänge von 600 nm (OD 660) betrug 12,5.

[0039] 0,5 ml dieser Schüttelkolbenkultur wurden mit 4,5 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und davon 0,7 ml zum Beimpfen von 1900 ml Anzuchtsmedium verwendet, die in einem 21 Literfermenter vom Typ BioStar® MD der Firma Braun Biotech Biotech GmbH (Meisingen, Deutschland) vorlagen.

[0040] Das Anzuchtsmedium wurde folgendermassen zubereitet. Eine Lösung bestehend aus 9,81 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,7 g KH_2PO_4 , 1,402 g K_2HPO_4 , 0,70 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, und 28,04 g Maisquelwasser in 1900 ml Leitungswasser wurde auf pH 6,5 mit 25%iger Ammoniaklösung eingestellt und im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Zu dieser Maisquelwasser halitigen Salzlösung wurde eine separata sterilisierte Lösung, die in 100g destilliertem Wasser 40,62 g Glucose und 0,0042 g Thiamin-HCl enthielt, unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

[0041] Die Fermentation erfolgte für 18 Stunden bei

37°C und einer Belüftung von 1 vvm. Der Gelöstsauerstoff wurde bei 20% und der pH bei 6,5 gehalten. Als pH-Korrekturmittel wurde 25%ige Ammoniaklösung eingesetzt. Die optische Dichte betrug 13,1. 90 ml dieser Kultur wurde zum Beimpfen von 1144 ml Wachstumsmedium für die Hauptfermentation in einem 21 Literfermenter vom Typ BioStar® MD verwendet.

[0042] Das Wachstumsmedium wurde folgendermassen zubereitet. Eine Lösung bestehend aus 4,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,744 g KH_2PO_4 , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,83 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0124 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 18,87 g β -Alanin, 0,74 g Struktur J647 und 49,72 g Maisquelwasser in 1144 ml Leitungswasser, wurde auf pH 6,5 mit 25%iger Ammoniaklösung eingestellt und im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Zu dieser Maisquelwasser halitigen Salzlösung wurde eine separata sterilisierte Lösung, die in 100 ml destilliertem Wasser 95,92 g Glucose, und 0,002 g Thiamin-HCl enthielt, unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

[0043] Die Fermentation erfolgte für 40 Stunden bei 37°C. In der Wachstumsphase betrug der pH 6,6 und die Belüftung 1 vvm. In der Produktionsphase betrug der pH 6,0 und die Belüftung 1,5 vvm. Der Gelöstsauerstoff wurde in beiden Phasen unter 2% gehalten. Als pH Korrekturmittel wurde die 25%ige Ammoniaklösung verwendet. Während der Fermentation wurden das Produktionsmedium 1, das Produktionsmedium 2 stufenweise zugefügt. Maisquelwasser wurde während der Kultivierung einmalig zugegeben. Das Produktionsmedium enthält in 584 ml Leitungswasser 465,29 g Glucose und 0,0261 g Thiamin-HCl, die sterilisiert wurden. Das Produktionsmedium 2 enthält 37,5 g β -Alanin in 140 ml Leitungswasser, welches bei 121°C 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert wurde. Nach einer Fermentationszeit von 7,5 Stunden bis zum Ende der Kultivierung wurde das Produktionsmedium 1 stufenweise zugefügt. Nach 10,5 Stunden Kultivierung wurden zusätzliche 49,5 g Maisquelwasser, welches in 100 ml Leitungswasser gelöst waren und für 20 Minuten bei

45 121°C im Autoklaven sterilisiert wurden, unter sterilen Bedingungen zugegeben. Nach einer Fermentationszeit von 12,5 Stunden bis zum Ende der Kultivierung wurde das Produktionsmedium 2 mit einer Dosierleitung von 3,5 g/h zugefügt. Nach 41 Stunden der Kultivierung wurde in der Fermentationstrühe eine Pantothensäurekonzentration 6,1 Gew.-% gefunden.

[0044] Das Gehalt an D-Pantothensäure wurde mit Hilfe einer HPLC-(Hochleistung Flüssig Chromatographie) Anlage vom Typ M321 der Firma Kneuer (Berlin, Deutschland) mittels RI-(Refraction Index) Detektion unter Verwendung einer Hypersil APS2 Aminophase von 5 μm Korngrösse bestimmt.

55 Beispiel 2

[0045] Bei einem Fermentationsversuch, der unter gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt wurde, konnte nach einer Kultivierungszeit

von 43 Stunden eine Pantothenäurekonzentration von 5,4 Gew.-% in der Fermentationsbrühe nachgewiesen werden. Die Konzentration an L-Valin betrug 8 g/l.

Beispiel 3

Herstellung von D-Calcium-Pantothenat

[0046] Aus einer pantothenäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothenäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe mit einer Laborzentrifuge vom Typ Biofuge-Straus der Firma Heraeus (Düsseldorf, Deutschland) für 20 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand anschließend durch Cross-Flow-Ultrafiltration mit einer MRC Polymermembran von 30kD in einer UF-Anlage der Firma ICT GmbH (Bad Hornburg, Deutschland) weiter gereinigt.

[0047] Anschließend wurde unter Röhren absatzweise 10,1 g festes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach ca. 10,3. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedampft. Die so eingedampfte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Calciumsalzes der D-Pantothenäure spritzgetrocknet. Hierzu wurde ein Labortrockner vom Typ Büchi-190 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstemperatur von 85°C, einer Druckdifferenz von 40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 600 NLu/h eingesetzt.

[0048] Das so hergestellte Calcium D-Pantothenat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 68,5 Gew.-% D-Pantothenäure, war rieselfähig und hatte eine Schütt-dichte von 460 mg/ml. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothenäure 67,6 Gew.-%.

Beispiel 4

Herstellung von D-Natrium-Pantothenat

[0049] Aus einer pantothenäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothenäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 3 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0050] Anschließend wurde unter Röhren absatzweise 10,6 g NaOH (99%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 10. Die so behandelte

Brühe wurde dann unter Vakuum bei 50–80°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedampft. Die so eingedampfte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Natriumsalzes der D-Pantothenäure in einem Gefriertrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold (Köln, Deutschland) lyophilisiert.

[0051] Das so hergestellte Natrium D-Pantothenat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 63,8 Gew.-% D-Pantothenäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothenäure 63,0 Gew.-%.

Beispiel 5

Herstellung von D-Magnesium-Pantothenat

[0052] Aus einer pantothenäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach dem Verfahren von Beispiel 1 und 2 hergestellt wurde und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothenäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so wie in Beispiel 2 beschrieben zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0053] Anschließend wurde unter Röhren absatzweise 10,4 g festes MgO (97%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 9 bis 10. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 50–60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedampft. Die so eingedampfte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Magnesiumsalzes der D-Pantothenäure in einem Gefriertrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0054] Das so hergestellte Magnesium D-Pantothenat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 64,7 Gew.-% D-Pantothenäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothenäure 64,4 Gew.-%.

Beispiel 6

Herstellung von D-Kalium-Pantothenat

[0055] Aus einer pantothenäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothenäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 2 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0056] Anschließend wurde unter Röhren absatzweise 17,4 g KOH (95%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 10 bis 11. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-

120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingeengt. Die so eingeengte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Kaliumsazes des D-Pantothensäure in einem Gefrier trockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0057] Das so hergestellte Kalium D-Pantothensäure halige Produkt besaß einen Gehalt von 63,5 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothensäure 62,9 Gew.-%.

Beispiel 7

Herstellung von D-Ammonium-Pantothensäure

[0058] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 2 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0059] Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingeengt. Die so eingeengte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Ammoniumsazes des D-Pantothensäure in einem Gefrier trockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0060] Das so hergestellte Ammonium D-Pantothensäure halige Produkt besaß einen Gehalt von 66,8 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig.

Beispiel 8

Herstellung von D-Calcium-Pantothensäure aus einer biomassehaltigen Fermentationsbrühe

[0061] Eine pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) ein Volumen von 1,0 l auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 30% Trockengehalt eingeengt. Anschließend wurde unter Röhren abzettweise 10,1 g festes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugeworfen. Der pH-Wert betrug danach ca. 10. Die so behandelte und eingeengte biomassehaltige Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Calciumsazes der D-Pantothensäure sprühgetrocknet. Hierzu wurde ein Laborsprühgetrockner vom Typ Büchi-190 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstemperatur von 85°C, einer Druckdifferenz von -40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 600 NL/h eingesetzt.

[0062] Das so hergestellte Calcium D-Pantothensäure halige Produkt besaß einen Gehalt von 49,8 Gew.-% D-Pantothensäure, war rieselfähig und hatte eine Schütt dichte von 480 mg/ml. Der Biomasse-Gehalt betrug ca. 30 Gew.-%.

Beispiel 9

Herstellung eines D-Calcium-Pantothensäure und Biomasse von *Corynebacterium glutamicum* enthaltenden Produktes

16

1. Herstellung eines Pantothensäure produzierenden Stammes von *Corynebacterium glutamicum*

[0063] In der Patentschrift US-A-5,188,948 ist der L-Vallin produzierende Stamm *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763 beschrieben. Aus der DE 19855313.7 ist das Plasmid pND-DBC2 (Abbildung 1) bekannt, welches die Gene *panB*, *panC* und *panD* von *Corynebacterium glutamicum* trägt. Das Plasmid ist in

20 Form des Stammes ATCC13032/pND-DBC2 als DSM 12437 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) hinterlegt. Durch Transformation des Stammes FERM BP-1763 mit dem Plasmid pND-DBC2 entstand der Pantothensäure produzierende Stamm FERM BP-1763/pND-DBC2.

2. Herstellung einer Pantothensäure haligen Fermentationsbrühe

24

[0064] Eine Probe von *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763/pND-DBC2 wurde auf HHK-Agar ausgestrichen.

[0065] HHK-Agar besteht aus Hirn-Herz-Agar, der von der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung des HHK-Agars ist in Tabelle 6a angegeben.

[0066] Diese Agarplatten-Kultur wurde 17 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Ausgewählte Einzelkolonien wurden anschließend auf dem gleichen Medium weiter vermehrt. Mit einer Impföse wurde Zellsmaterial eines Klons vom HHK-Agar abgenommen und in 100 ml. HHK-Bouillon übertragen, die in einem Schüttelkolben von 1000 ml. Gesamtvolume enthalten waren.

[0067] HHK-Bouillon besteht aus Hirn-Herz Medium, das von der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit Glucose und Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung der HHK-Bouillon ist in Tabelle 6b angegeben.

Tabelle 8a

HHK-Agar	
Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Agar	52,0 g
Kanamycin	25 mg

Tabelle 8b

HHK-Bouillon	
Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Medium	37,0 g
Kanamycin	25 mg
Glucose	20,0 g

[0068] Der Ansatz wurde bei 30°C und 150 rpm für 22 Stunden inkubiert. Nach Ende der Kultivierung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 650 nm (OD 660) eine optische Dichte von 6,1 gemessen. Diese Kultur des Stammes FERM BP-1783/pND-DBC2 wurde zur Beimpfung des Produktionsfermenters verwendet.

[0069] Zur Fermentation wurde das in Tabelle 8c angegebene Medium SK-71 verwendet. Alle Komponenten des SK-71-Mediums wurden direkt entsprechend der Arbeitskonzentrationen im Fermenter vorgelegt und *in situ* sterilisiert.

Tabelle 8c

Medium SK-71	
Verbindung	Menge pro Liter
Glucose Hydrat	110,0000g
Cornsteep liquor (CSL)	5,0000g
β-Alanin	5,0000g
Nicotinsäure	0,0050g
l-Histidin	0,1500g
Hornserin	0,1500g
Ammoniumsulfat	25,0000g
K-dihydrogenphosphat	0,1000g
Mg-Sulfat 7H ₂ O	1,0000g
Fe-Sulfat 7H ₂ O	0,0100g
Mn-Sulfat H ₂ O	0,0050g

Tabelle 8c (fortgesetzt)

Medium SK-71	
Verbindung	Menge pro Liter
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,0100g
Thiamin HCl	0,0002g
D(+)-Biotin	0,0003g
Struktol	0,60g

[0070] Als Fermenter wurden 10 l Rührreaktoren der Firma B.Braun (BBI, Deutschland, Melsungen, Modell Biostat E/ED) verwendet.

[0071] Zur Inkultierung von 1950 g des Fermentationsmediums SK-71 wurden 100 ml der oben beschriebenen Schüttelkolbenkultur in HHK-Bouillon eingesetzt.

[0072] Der Ansatz wurde über die gesamte Fermentationsdauer bei einer Temperatur von 30°C, einer volumenspezifischen Belüftung von 0,75 vvm, einer vom Sauerstoffverbrauch abhängigen Rührung von 800 - 1700 rpm und einem pH von 7,0 und einem Sauerstoffpartialdruck von 20% der Luftsättigung kultiviert. Die Kultur wurde insgesamt für 49 Stunden unter den obengenannten Bedingungen bis zum Erreichen einer OD660 von 26,2 kultiviert. Als Korrektummittel zur pH-Wertregulierung wurde eine wässrige Ammoniumlösung (25 % w/v) verwendet.

[0073] Anschließend wurden die optische Dichte (OD) mit einem Digitalphotometer vom Typ LP1W der Firma Dr. Bruno Lange GmbH (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm und die Konzentration an gebildeter D-Pantothensäure mittels HPLC(Hypersil APS 2 5 µm, 250x5 mm, RI-Detektion) bestimmt.

[0074] In der Fermentationsendprobe wurde nach 49 Stunden eine D-Pantothensäure Konzentration von ca. 0,2 g/l gemessen.

[0075] 3. Herstellung eines Pantothensäure haltigen Produktes

[0076] Eine D-Pantothensäure haltige Fermentationsbrühe mit einem Gehalt von etwa 0,02 Gew.-% D-Pantothensäure wurde nach dem Verfahren von Beispiel 9.2 hergestellt. Ein Volumen von 1,4 l dieser Fermentationsbrühe wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) auf eine Brühe von etwa 15% Trockengewicht eingedampft. Anschließend wurde unter Röhren absetzweise, 27,1 g festes Ca(OH)₂ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben.

[0077] Der pH-Wert betrug danach ca. 10,0. Die so behandelte und eingedampfte biomassehaltige Brühe wurde anschließend mit 37,7 g Calcium D-Pantothensäure (>98 %, Euro OTC Pharma GmbH, Kamen, Deutschland) versetzt.

Für die anschließende Sprühtröcknung wurde ein Laborsprühtröckner vom Typ Büchi-190 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstemperatur von 85°C, einer Druckdifferenz von 40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 600 Nl/h eingesetzt.

[0076] Das so hergestellte Calcium D-Pantothensäure-haltige Produkt besaß einen Gehalt von ca. 35 % D-Pantothensäure, war fischfähig und hatte eine Schütt-dichte von 800 mg/ml. Der Anteil an *C. glutamicum* - Biomasse betrug ca. 3,5 Gew.-%.

Beispiel 10

Herstellung eines D-Calcium-Pantothensäure und Biomasse von *Saccharomyces cerevisiae* enthaltenden Produktes

1. Herstellung eines Pantothensäure produzierenden Stamms von *Saccharomyces cerevisiae*

Amplifikation des Leserasters YHR063c:

[0077] Ausgehend von der Nukleotidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Leserasters YHR063c (Accession Nr. U00051 des National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA) wurde die nachstehenden PCR-Primer synthetisiert (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Anfang bzw. Ende des Leserasters sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet:

- oJD539 (5' EcoRI-NotI START):
5'- GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA
GAG GAG AAA TTA ACT ATG ACT GCA CCA CAC
AGA AG -3'
- oJD540 (3' SpeI-PstI STOP):
5'- CGC GAC TAG TCT GCA GTC AGT CCT TTC
TCC AGT CAC -3'

[0078] Als Template diente genomische DNA des *S. cerevisiae* Stamms JD242, die nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991) isoliert wurde. Dieser Stamm ist eine haploide Segregante des diploiden Stamms SC285C (Winzler et al., Yeast 11, 53ff. (1995)), dessen Genom sequenziert wurde (Goffeau et al., Science 274, pp. 546, (1996)). Die Tetradenanalyse erfolgte nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Der Stamm JD242 ist auxotroph für Leucin (leu2Δ1 Allel) und Uracil (ura3Δ2 Allel). Ein etwa 1,2 kB großes DNA-Fragment konnte unter Verwendung des „High Fidelity Expand Polymerase“-Kits der Firma Roche (Mannheim) durch 28 PCR-

Zyklen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen amplifiziert werden. Die Größe wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestimmt.

5

Konstruktion von pJD-YHR063c:

[0079] Zur Expression des YHR063c Leserasters in *S. cerevisiae* wurde das PCR-Amplifikat in den *E. coli* - *S. cerevisiae* Pendelvektor pJDCEX2 eingebaut (Abbildung 2 und Dohmen et al., 1995, Journal of Biological Chemistry 270, 18099-18109).

[0080] Das PCR-Produkt wurde zunächst mit EcoRI und SpeI (AGS, Heidelberg, Deutschland) 15 restriktiert. Anschließend wurde es mit pJDCEX2-DNA, welche mit EcoRI und XbaI (AGS, Heidelberg, Deutschland) behandelt worden war, gemischt und mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm

20 XL1-Blue (Bullock et al., 1987, Biotechniques 5, 378) transformiert. Transformanten wurde durch Selektion auf LB-Agar, welcher 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Darmstadt, Deutschland) enthielt, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch 25 alkalische Lysis präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch Restriktion mit NotI und PstI und anschließender Auftrennung in 0,8%igen Agarosegel 30 untersucht. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen pJD-YHR063c (Abbildung 3).

Herstellung von Stamm JD242/pJD-YHR063c:

[0081] Der *S. cerevisiae* Stamm JD242 wurde mit dem Plasmid pJD-YHR063c nach der Methode von Dohmen et al. transformiert (Dohmen et al., Yeast 7, 591 (1991)). Die Selektion auf Transformanten erfolgte auf leucinfreiem Minimalmedium SD mit 1,8% 40 Ager (siehe Tabelle 9a und 9b).

Tabelle 9a

Minimalmedium SD	
Verbindung	Menge pro Liter
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl_2	0,1 g
H_3BO_3	500 µg
CuSO_4	40 µg
KI	100 µg

Tabelle 9a (fortgesetzt)

Minimalmedium SD	
Verbindung	Menge pro Liter
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200 µg
MnSO ₄ · 2 H ₂ O	400 µg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	400 µg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	200 µg
Biotin	2 µg
Folsäure	2 µg
Inositol	2 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoësäure	200 µg
Pyridoxin Hydrochlorid	400 µg
Riboflavin	200 µg
Thiamin Hydrochlorid	400 µg

Tabelle 9b

Minimalmedium SD	
Zusätze	Menge pro Liter
Glucose	20 g
Uracil	40 mg
CuSO ₄	24 mg
-Leu D0 Supplement	850 mg
Ketopantoat	100 mg
β-Alanin	100 mg

2. Herstellung einer Pantothenäure haltigen Fermentationsbrühe

[0082] Zur Herstellung einer D-Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe wurde zunächst eine Einzelkolonie von *S. cerevisiae* Stamm JD242/pJD-YH9063c auf einer Agarplatte mit Minimalmedium SD ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Herstellung dieser ersten Vorkultur im Schüttelkolben wurden anschließend die Zellen mit 5 mL des Minimalmediums SD abgeschwemmt. Mit 2,5 mL dieser Zellsuspension wurde dann jeweils ein Schüttelkolben (500 mL Gesamtvolumen) mit 50 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) angeimpft und bei 30°C und 130 rpm auf einem RC-1-TK Inkubator der Firma Infras AG (Bottmingen, Schweiz) für 6 Stunden kultiviert, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD660) von 1,9 gemessen werden konnte. Die zweite Vorkultur wurde in einem 1.000 mL Schüttelkolben in

150 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) ange-
setzt und mit jeweils 50 mL der oben beschriebenen Vorkultur 1 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 80 rpm für 20 Stunden, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD 660) von ca. 3,8 erreicht wurde. Die Hauptfermentation zur Produktion der Pantothensäure wurde im Rundkolben mit 6000 mL Gesamtvolumen in 1500 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) durchgeführt. Hierzu wurde der Rundkolben mit jeweils 90 mL der Vorkultur 2 beimpft und anschließend bei 30°C und 80 rpm für 30 Stunden inkubiert.

[0083] Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Digitalphotometer vom Typ LP1W der Firma Dr. Bruno 15 Lange GmbH (Berlin, Deutschland) bei einer Meßwellen-
länge von 660 nm gemessen. Die Bestimmung der Konzentration an gebildeter D-Pantothensäure erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" 20 der Firma DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984).

[0084] Die optische Dichte (OD660) betrug ca. 4 und der Gehalt an D-Pantothensäure etwa 1 mg/l.

2. Herstellung eines Pantothensäure haltigen Produktes

[0085] Eine pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe mit einem Gehalt von etwa 1 mg/l D-Panto-
thensäure wurde nach dem Verfahren von Beispiel 10.2 30 hergestellt. Ein Volumen von 6,0 l wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-151 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) zu einer Brühe von 35 etwa 16% Trockengehalt eingeeignet. Anschließend wurde unter Röhrenabsatzweise 15,9 g festes Ca(OH)₂ (98%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zuge-
geben. Der pH-Wert betrug danach ca. 9,2. Die so behandelte und eingeigte biomassehaltige Brühe 40 wurde anschließend mit 28,4 g Calcium D-Pantothenat(>98 %, Euro OTC Pharma GmbH, Kamen, Deutschland) versetzt. Die Brühe wurde anschließend in einem Gefriertrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Laybold (Köln, Deutschland) lyophilisiert.

[0086] Das so hergestellte Calcium D-Pantothenat 45 Produkt besaß einen Gehalt von 26,5 Gew.-% D-Pantothensäure, war rieselfähig und hatte eine Schütt-
dichte von 450 mg/ml. Der Anteil an *S. cerevisiae*-Bio-
masse betrug ca. 6,6 Gew.-%.

Abbildungen:

[0087] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

55 Abbildung 1: Karte des Plasmids pND-DBC2

Abbildung 2: Karte des Plasmids pJDCEX2

Abbildung 3: Karte des Plasmids pJD-YH9063c

[0088] Die verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

Zu Abbildung 2 und 3:

[0090]

Zu Abbildung 1:

[0089]

rrnBT1T2:	Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens	5	LEU2:	Beta-Isopropylmalat Dehydrogenase-Gen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ptac:	Iac Promotor	10	2 μ :	Sequenzen des endogenen 2 μ Plasmides von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
panB:	Kodierbereich des panB Gens	15	Ap ^R :	Beta-Lactamase-Gen
panC:	Kodierbereich des panC Gens	20	P-CUP1:	Promoter des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CUP1-Gens (Metallothionein)
penD:	Kodierbereich des panD Gens	25	T-CYC1:	Terminator des CYC1-Gens (Cytochrom C) von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
rep-C.g.:	DNA-Region für Replikation in C. glutamicum	30	SD:	Shine Dalgarno Sequenz
oriV-E.c.:	Ursprung für vegetativen Transfer in E. coli	35	EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
kan:	Resistenzgen für Kanamycin	40	NotI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym NotI
BgII:	Schnittstelle des Restriktionsenzym BgII	45	SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SalI
ClaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym ClaI	50	XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI
NcoI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym NcoI	55	Patentansprüche	
NruI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym NruI	60	1. D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltende Tierfuttermittel-Additive auf Fermentationsbrühe-Basis, dadurch gekennzeichnet, daß sie	
PvuI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PvuI	65	a) D-Pantothensäure und/oder deren Salze, b) die während der Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden Mikroorganismen gebildete Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %, c) zumindest den überwiegenden Teil der weiteren Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe enthalten und d) in fester, feinteiliger oder granulierter, fließfähiger Form vorliegen.	
SacI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SacI	70	2. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,	
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SalI	75	daß sie eines oder mehrere der Salze, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalze der D-Pantothensäure enthalten.	
ScaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym ScaI	80	3. Tierfuttermittel-Additive gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,	
SphI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI	85		
XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI	90		

daß sie die D-Pantothensäure und/oder eines ihrer Salze in einer Menge von > 0, insbesondere 20 bis 80 Gew.-%, (Trockenmasse) enthalten.

4. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß sie in sprühgetrockneter oder sprühgranulierter Form vorliegen.

5. Tierfuttermittel-Additive gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
daß sie zusätzlich eine oder mehrere der L-Aminosäuren enthalten, ausgewählt aus der Gruppe L-Methionin, L-Lysin, L-Valin, L-Alanin, L-Threonin oder L-Tryptophan.

6. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltenden Futtermittel-Additiven gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 aus Fermentationsbrühen, dadurch gekennzeichnet, daß man
 a) aus D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltenden Fermentationsbrühen gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse und/oder einen Teil der weiteren Inhaltsstoffe abtrennt,
 b) die so erhaltene Lösung bzw. Brühe mit dem Hydroxid oder Oxid eines Erdalkali- oder Alkalimetalls versetzt und
 c) das so erhaltene Gemisch trocknet oder sprühgetrocknet, sprühgranuliert oder granuliert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Oxid oder Hydroxid, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumverbindungen, in einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,8 bis 1,2 vorzugsweise 0,95 bis 1,1 bezogen auf die D-Pantothensäure zusetzt.

8. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure und/oder deren Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calcium-Salze enthaltenden Futtermittel-Additiven gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man
 a) aus einer unter Verwendung der gewünschten Hydroxyverbindungen gewonnenen D-Pantothenathaltigen Fermentationsbrühe

9. gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse und/oder einen Teil der Inhaltsstoffe abtrennt,
 b) das so erhaltene Gemisch vorzugsweise durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert, und
 c) das das entsprechende Pantothenat enthaltende Futtermitteladditiv durch Trocknen, Sprühgetrocknen oder Sprühgranulieren in fester Form gewinnt.

10. Verfahren zur Herstellung von Tierfuttermittel-Additiven mit einem Gehalt an D-Pantothensäure und/oder dessen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalzen in dem Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% (Trockenmasse) aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
 a) bevorzugt Entfernen von Wasser aus der Fermentationsbrühe (Aufkonzentrierung),
 b) gegebenenfalls Entfernen der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %,
 c) Zusatz von einer oder mehreren der genannten Verbindungen zu den gemäß a) und b) erhaltenen Fermentationsbrühen, wobei die Menge der zugesetzten Verbindungen so bemessen ist, daß deren Gesamtkonzentration im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% liegt, und
 d) Trocknen der gemäß c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
daß man in der Fermentation Pilze oder Hefen einsetzt

12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
daß man der gegebenenfalls aufkonzentrierten

Fermentationsbrühe eine oder mehrere L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Alanin, L-Threonin oder L-Tryptophan zuseztl.

5

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in der Fermentation Bakterien der
Gattung *Corynebacterium* einsetzt. 10

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in der Fermentation Bakterien der 15
Familie *Enterobacteriaceae* einsetzt.

20

25

30

35

40

45

50

55

14

Abbildung 1:

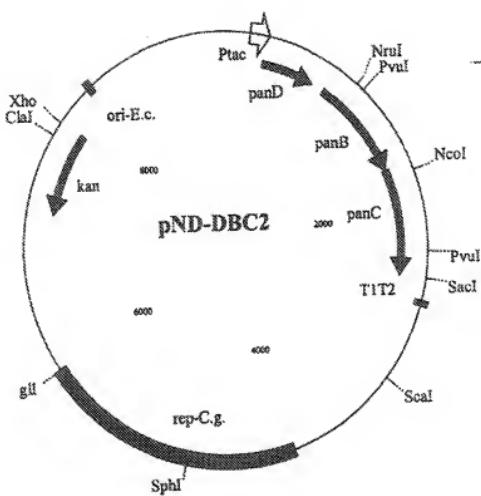


Abbildung 2:

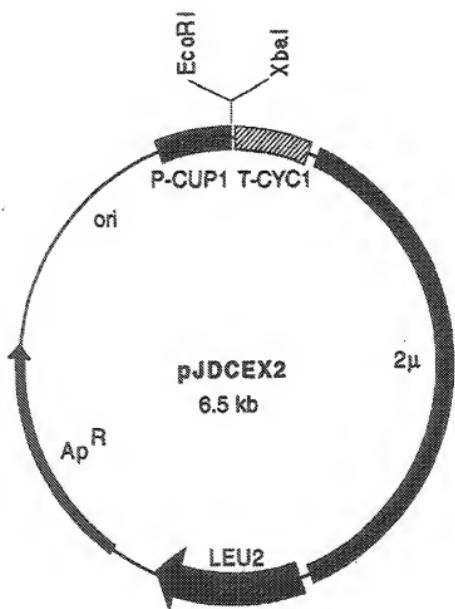
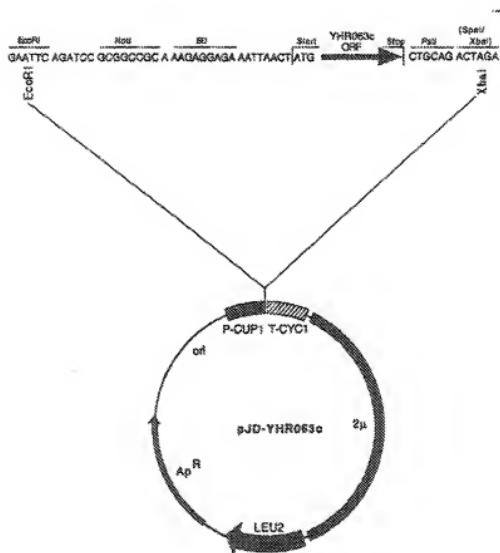


Abbildung 3:





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.CI.)
X	GB 598 177 A (COMMERCIAL SOLVENTS CORPORATION) 12. Februar 1948 (1948-02-12) * Seite 1, Zeile 42-47 * * Seite 2, Zeile 9-19 * * Anspruch 1 *	1,3,4,6, 8	A23K1/16
Y		2,5,	
A		12-14	
Y	GB 784 434 A (MERCK & CO., INC.) 9. Oktober 1957 (1957-10-09) * Seite 1, Zeile 10-25 * * Seite 2, Zeile 4-15 * * Ansprüche 1,6 *	9-11 2	
A	---	7	
Y	EGGELING, L., MORBACH, S., AND SAHM, H.: "The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i> " JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY., Bd. 56, 1997, Seiten 167-182, XP004103426 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM.. NL ISSN: 0168-1656 * Seite 167, Spalte 1 - Seite 169, Spalte 1; Abbildung 1 *	5,12-14	RISCHERCHERHEFTE SACHGEBIETE (Int.CI.) A23K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Rechercherin	Ablaufdatum der Recherche	Name	
DEN HAAG	18. August 2000	Rooney, K	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allen befasst Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung gleicher Kategorie A : von besonderer Bedeutung B : von besonderer Bedeutung D : einschließlich Offenbarung P : Zweckentfernt			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : öffentlich Patentable Erfindungen, die jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht werden D : in der Anmeldung angeführte Dokumente L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie übernommenes Dokument			

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 00 10 8826

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

18-08-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 598177 A		KEINE	
GB 784434 A		KEINE	